

[11] Patent/Publication Number: **JP2002087982A**

[43] Publication Date: **Mar. 27, 2002**

[54] VASCULARIZATION STIMULATOR, VASCULARIZATION INHIBITOR AND
METHOD FOR SCREENING THEM

[72] Inventor(s):

IIDA SHINJI

NAKAMURA ITSUKI

[71] Assignee/Applicant:

NIPPON KAYAKU CO LTD

[21] Application Number: **2000276519 JP2000276519 JP**

[22] Application Date: **Sep. 12, 2000**

[51] Int. Cl.⁷: **A61K03800 ; A61K04500; A61P00702; A61P00900; A61P00910; A61P01300;**
A61P01702; A61P01902; A61P02702; A61P02900; A61P03500; A61P04300

[57] **ABSTRACT**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an excellent vascularization stimulator usable as a medicinal-therapy agent for cardiovascular diseases or injuries, and the like, or for screening vascularization inhibitors.

SOLUTION: The vascularization stimulator contains a urotensin II-like peptide compound shown by formula (1) (wherein, R1 is Glu, GlyPro, PyrPro, GlnHisGlyThr, PyrHisGlyThr, GlnHisGlyAla, PyrHisGlyAla, AlaGlyAsn, AlaGly, GlyGly, GlySer or AsnAsn; R2 is Thr, Ala, Leu, Gly, Asn or Phe; R3 is Pro, Ser, Ala or Thr; R4 is Asp or Glu; and R5 is Val or Ile) or its pharmaceutically permissible salt as an active ingredient.

* * * * *

This Page Blank (uspto)

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-87982

(P2002-87982A)

(43)公開日 平成14年3月27日(2002.3.27)

(51) Int.C1.	識別記号	F I	マーク (参考)
A61K 38/00		A61K 45/00	4C084
45/00		A61P 7/02	
A61P 7/02		9/00	
9/00		9/10	
9/10		13/00	

審査請求 未請求 請求項の数12 O.L (全10頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000-276519(P2000-276519)	(71)出願人 000004086 日本化薬株式会社 東京都千代田区富士見1丁目11番2号
(22)出願日	平成12年9月12日(2000.9.12)	(72)発明者 飯田 真嗣 埼玉県北本市西高尾8-13
		(72)発明者 中村 巍 埼玉県大宮市北袋町2-336-306
		Fターム(参考) 4C084 AA02 AA17 BA01 BA08 BA18 BA24 MA01 NA14 ZA332 ZA362 ZA392 ZA402 ZA512 ZA542 ZA812 ZA892 ZA962 ZB112 ZB152 ZB222 ZB262

(54)【発明の名称】血管新生促進剤、血管新生阻害剤又はそのスクリーニング方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】循環器疾患もしくは創傷の薬物療法剤等として、又、血管新生阻害剤のスクリーニングに利用できる優れた血管新生促進剤の提供。

【解決手段】ウロテンシンII様ペプチド化合物(1)又はその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する血管新生促進剤。

$R_1 - R_2 - R_3 - R_4 - \overline{Cys - Phe - Tyr - Lys - Tyr - Cys} - R_5 \quad (1)$

(式中、R₁は、Glu-、Gly-Pro-、Pyr-Pro-、Gln-His-Gly-Thr-、Pyr-His-Gly-Thr-、Gln-His-Gly-Ala-、Pyr-His-Gly-Ala-、Ala-Gly-Asn-、Ala-Gly-、Gly-Gly-、Gly-Ser-又はAsn-Asn-を示し、R₂は、Thr、Ala、Leu、Gly、Asn又はPheを示し、R₃は、Pro、Ser、Ala又はThrを示し、R₄は、Asp又はGluを示し、R₅は、-Val又は-Ileを示す。)

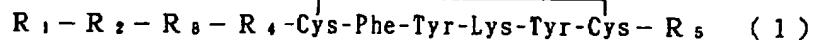
【特許請求の範囲】

【請求項1】ウロテンシンII様ペプチド化合物又はその
薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する血管
新生促進剤。

【請求項2】ウロテンシンII様ペプチド化合物が一般式

〔1〕

〔化1〕

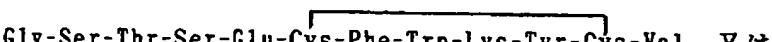
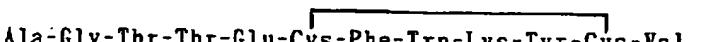
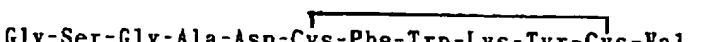
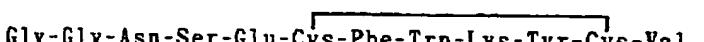
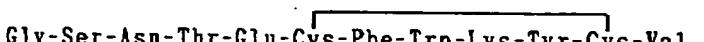
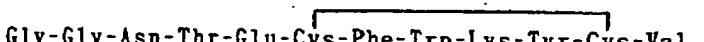
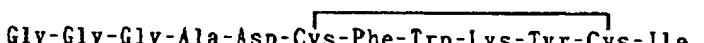
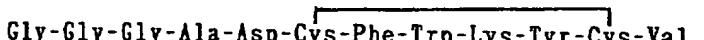
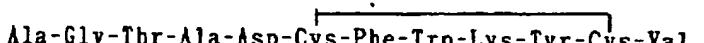
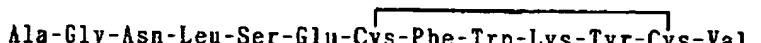
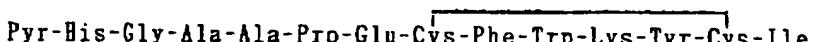
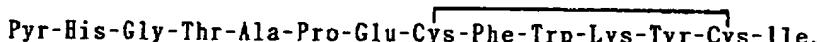
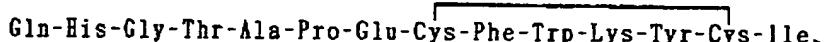
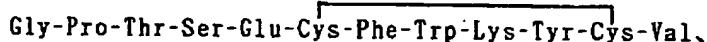


(式中、R₁は、Glu-、Gly-Pro-、Pyr-Pro-、Gln-His-Gly-Thr-、Pyr-His-Gly-Thr-、Gln-His-Gly-Ala-、Pyr-His-Gly-Ala-、Ala-Gly-Asn-、Ala-Gly-、Gly-、Gly-Ser-又はAsn-Asn-を示し、R₂は、Thr-、Ala-、Leu、Gly、Asn又はPheを示し、R₃は、Pro-、Ser、Ala又はThrを示し、R₄は、Asp又はGlu

を示し、R₅は、-Val又は-Ileを示す。)である請求項1に記載の血管新生促進剤。

【請求項3】ウロテンシンII様ペプチド化合物が下記のアミノ酸配列を有する化合物である請求項1に記載の血管新生促進剤。

〔化2〕



【請求項4】ウロテンシンII様ペプチド化合物が下記のアミノ酸配列を有する化合物である請求項1に記載の血

〔化3〕

Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val,
 Gly-Pro-Thr-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val,
 Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-1le,
 Pyr-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-1le,
 Gln-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-1le、又は
 Pyr-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-1le

【請求項 5】ウロテンシンII様ペプチド化合物が下記の
 アミノ酸配列を有する化合物である請求項 1 に記載の血

管新生促進剤。

【化 4】

Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val

【請求項 6】請求項 1 に記載のペプチド化合物又はその
 塩の血管新生作用を指標として血管新生阻害剤をスクリ
 ニングすることを特徴とする方法。

【請求項 7】ペプチド化合物又はその塩が請求項 2 に記
 載のものである請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】ペプチド化合物又はその塩が請求項 3 に記
 載のものである請求項 6 に記載の方法。 20

【請求項 9】ペプチド化合物又はその塩が請求項 4 に記
 載のものである請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】ペプチド化合物又はその塩が請求項 5 に
 記載のものである請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】実験動物の角膜における反応を利用した
 請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】ウロテンシンII様ペプチド化合物の血管
 新生作用に拮抗する化合物又はその薬理学的に許容され
 る塩を有効成分とする血管新生阻害剤。 30

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、医薬品組成物と
 して有用な血管新生促進剤、血管新生阻害剤又はそのスクリ
 ニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】血管新生は、既存の血管から小血管が形
 成される現象である。心筋梗塞等種々の循環器疾患の予
 後は、多くの因子によって影響を受けるが、側副血行路
 の発達の程度は、最も重要な予後決定因子の一つである
 と考えられている。側副血行路の充分な発達があれば、
 狹窄や閉塞が生じても、虚血や組織の壊死が押さえられ、
 梗塞サイズの縮小や予後の改善が得られる。従来、
 側副血行路形成の機序として、血管内圧や血流の変化が
 重要視されてきたが、側副血行路形成時に血管内皮細胞
 や血管平滑筋細胞にDNA合成を伴う細胞分裂像が認め
 られることが報告され、側副血行路の形成過程は、単に
 既存の吻合血管の物理的要因による拡張だけでなく、少
 なくともその一部は血管壁構成細胞の増殖が関与する血
 管新生の過程であると理解されるようになっている。そ 50

こで近年、「血管新生療法」という新しい治療法によつ
 て循環器疾患を治療しようという試みがなされてきてい
 る (Yanagisawa-Miwa, A. et al., Science, 257, 140
 1, 1992)。血管新生療法とは、虚血組織周辺の血管新
 生を促進することによって積極的に側副血行路を確保
 し、虚血組織を保護しようとする試みであり、薬物投与
 によるバイパス形成療法ともいえる新しい治療法であ
 る。しかし、未だ実用化には至っておらず、これに用い
 ることのできる優れた薬剤の開発が期待されている。一方、
 繊維芽細胞成長因子など血管新生促進活性をもつ物
 質を創傷の治療に利用する試みもなされてきている (Ho
 ckel, M. et al., Arch. Surg., 128, 423, 1993)。し
 かし、これも未だ実用化に至っておらず、優れた薬剤の
 開発が期待されている。

【0003】一方、疾患に関連して生じてくる血管新生
 がその進展に関わっている疾患も存在し、 固形腫瘍、糖
 尿病網膜症、及び炎症性疾患（慢性関節リウマチ）は、
 その代表的なものである。 固形腫瘍が増殖するには、血
 管新生によって栄養や酸素の供給と老廃物の除去の道を
 確保することが必須である。また、現在の癌治療上の大
 きな問題である転移において、その道を確保するとい
 う意味でも癌細胞主導による血管新生が重要なステップと
 なっている。糖尿病網膜症では、生じた血管新生その
 ものが病態となり、放置すると失明に至る。従って、こ
 れら疾患で生じてくる血管新生を抑制することが上記疾
 患の進展の予防及び治療に結びつくと考えられ、血管新
 生阻害剤の探索が精力的に行なわれてきている (Folkma
 n, J. et al., Science 275, 116, 1996)。しかし、今
 だ臨床的に満足できるような薬剤は無い。

【0004】ところで、ウロテンシンIIは、最初、硬骨
 魚類のウロフィシスというホルモン分泌器官より単離さ
 れた環状ペプチドである (Bern, H. A. et al., J. Endo
 crinol. 45, XI, 1969)。その後、魚類、両生類及びヒ
 トをも含む哺乳類より、C末端側の環状ヘキサペプチド
 を共通構造として有する幾つか異なる化学構造を有する
 ウロテンシンIIが見つかってきている (Coulouarn, Y.

et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 15803, 1998, Coulouran, Y., et al., FEBS Letters 457: 28-32, 1999 及び Hoare, S.R.J. Trends Pharmacol. Sci. 21: 80, 2000)。これらウロテンシンIIの作用としては、血管収縮作用 (Itoh, H., et al., Eur. J. Pharmacol. 149: 61-66, 1988 及び Ames, R.S. et al., Nature 401: 28 2, 1999) 及び心収縮力の減少作用 (Ames, R.S. et al., Nature 401: 282, 1999) が知られている。

【0005】また、ウロテンシンIIは、細胞膜上にあるウロテンシンIIの受容体を介して作用を示す (Itoh, H., et al., Eur. J. Pharmacol. 149: 61-66, 1988)。そして、その作用発現の一つとして、ウロテンシンIIは、GPR14やSENR (sensory epithelium neuropeptide-like receptor) と呼ばれる公知のGタンパク質共役型受容体 (Marchese, A., et al., Genomics 29: 335, 1995及びTal, M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 209: 752, 1995) を刺激して作用を示すことが知られている、即ちウロテンシンIIは、Gタンパク質共役型受容体GPR14を刺激する内因性の物質であることが知られている (Nothacker, H.-P., et al., Nature Cell Biol 1: 383, 1999, Liu, Q., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 266: 174, 1999, Mori, M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 265: 12 3, 1999 及び Ames, R.S. et al., Nature 401: 282, 1999)。このウロテンシンIIは、まず生体内で前駆体のブレプロウロテンシンIIが作られ、その後プロホルモンコンバーゼなどのペプチダーゼの作用により産生される (Coulouran, Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 15803, 1998)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】ところが、血管新生促

進作用を利用した循環器疾患もしくは創傷の薬物療法は、今だ実用化されておらず、これに用いることのできる優れた血管新生促進剤の提供が、重要な課題となっている。さらに、今だ臨床的に満足できる血管新生阻害剤が無い、さらにはそのような優れた血管新生阻害剤をスクリーニングする方法も無いため、血管新生が関わる 固形腫瘍、糖尿病網膜症、及び炎症性疾患等には十分な治療方法が無く、臨床的に満足できる新しい血管新生阻害剤の提供及びそのスクリーニング方法の提供が、特に重要な課題となっている。

【0007】

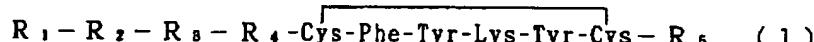
【課題を解決するための手段】そこで本発明者らは、血管新生を促進する化合物又は血管新生を阻害する化合物を見出すべく鋭意研究した結果、ウロテンシンII様ペプチド化合物又はその薬理学的に許容される塩が血管新生促進剤として極めて有用であることを見出した。更に、ウロテンシンII様ペプチド化合物又はその薬理学的に許容される塩の血管新生作用を指標として血管新生阻害剤をスクリーニングする方法を見出し、更に加えて、ウロテンシンII様ペプチド化合物の血管新生作用に拮抗する化合物又はその薬理学的に許容される塩が血管新生阻害剤として極めて有用であるという知見を得、本発明をなすに至った。即ち、本発明は次の(I)～(XII)に関するものである。

【0008】(I) ウロテンシンII様ペプチド化合物又はその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する血管新生促進剤。

(II) ウロテンシンII様ペプチド化合物が一般式
(1)

【0009】

【化5】



(式中、R₁は、Glu-、Gly-Pro-、Pyr-Pro-、Gln-His-Gly-Thr-、Pyr-His-Gly-Thr-、Gln-His-Gly-Ala-、Pyr-His-Gly-Ala-、Ala-Gly-Asn-、Ala-Gly-、Gly-Gly-、Gly-Ser- 又は Asn-Asn- を示し、R₂は、Thr、Ala、Leu、Gly、Asn 又は Phe を示し、R₃は、Pro、Ser、Ala 又は Thr を示し、R₄は、Asp 又は Glu を示し、R₅は、-Val 又は -Ile を示す。) である (I) に記載 40

の血管新生促進剤。

(III) ウロテンシンII様ペプチド化合物が下記のアミノ酸配列を有する化合物である (I) に記載の血管新生促進剤。

【0010】

【化6】

Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val,
 Gly-Pro-Thr-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val,
 Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile,
 Pyr-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile,
 Gln-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile,
 Pyr-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile,
 Ala-Gly-Asn-Leu-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val,
 Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val,
 Gly-Gly-Gly-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val,
 Gly-Gly-Gly-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile,
 Gly-Gly-Asn-Thr-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val,
 Gly-Ser-Asn-Thr-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val,
 Gly-Gly-Asn-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val,
 Gly-Ser-Gly-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val,
 Ala-Gly-Thr-Thr-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val,
 Gly-Ser-Thr-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val、又は
 Asn-Asn-Phe-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val

(IV) ウロテンシンII様ペプチド化合物が下記の [0011]
 アミノ酸配列を有する化合物である (I) に記載の血管 [化7]
 新生促進剤。 30

Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val,
 Gly-Pro-Thr-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val,
 Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile,
 Pyr-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile,
 Gln-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile、又は
 Pyr-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile

(V) ウロテンシンII様ペプチド化合物が下記の [0012]
 アミノ酸配列を有する化合物である (I) に記載の血管 [化8]
 新生促進剤。

Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val

(VI) (I) に記載のペプチド化合物又はその塩
 の血管新生作用を指標として血管新生阻害剤をスクリー
 ニングすることを特徴とする方法。
 (VII) ペプチド化合物又はその塩が (I I) に記
 載のものである (V I) に記載の方法。

(VIII) ペプチド化合物又はその塩が (I I I) に
 記載のものである (V I) に記載の方法。

(X I) ペプチド化合物又はその塩が (I V) に記
 載のものである (V I) に記載の方法。

50 (X) ペプチド化合物又はその塩が (V) に記載

のものである(VI)に記載の方法。

(XI) 実験動物の角膜における反応を利用した

(VI)～(X)のいずれか1項に記載の方法。

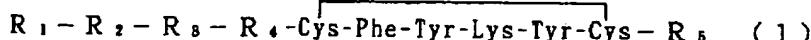
(XII) ウロテンシンII様ペプチド化合物の血管新生作用に拮抗する化合物又はその薬理学的に許容される塩を有効成分とする血管新生阻害剤。

[0013]

【発明の実施の形態】本発明において、ウロテンシンII様ペプチド化合物とは、下記部分構造

[0014]

10



(式中、R₁は、Glu-、Gly-Pro-、Pyr-Pro-、Gln-His-Gly-Thr-、Pyr-His-Gly-Thr-、Gln-His-Gly-Ala-、Pyr-His-Gly-Ala-、Ala-Gly-Asn-、Ala-Gly-、Gly-Gly-、Gly-Ser-又はAsn-Asn-を示し、R₂は、Thr、Ala、Leu、Gly、Asn又はPheを示し、R₃は、Pro、Ser、Ala又はThrを示し、R₄は、Asp又はGluを示し、R₅は、-Val又は-Ileを示す。)

[0016] 一般式(1)、R₁、R₂、R₃、R₄及びR₅において、これを構成する各種アミノ酸は、左側がN末端であり、右側がC末端である。

[0017] 一般式(1)、R₁、R₂、R₃、R₄及びR₅における、Gluとはグルタミン酸、Glyとは

表1

一般式(1)で表わされるペプチド化合物の具体例

化合物	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	Glu-	Thr	Pro	Asp	-Val
2	Gly-Pro-	Thr	Ser	Glu	-Val
3	Pyr-His-Gly-Thr-	Ala	Pro	Glu	-Ile
4	Gln-His-Gly-Thr-	Ala	Pro	Glu	-Ile
5	Gln-His-Gly-Ala-	Ala	Pro	Glu	-Ile
6	Pyr-His-Gly-Ala-	Ala	Pro	Glu	-Ile
7	Ala-Gly-Asn-	Leu	Ser	Glu	-Val
8	Ala-Gly-	Thr	Ala	Asp	-Val
9	Gly-Gly-	Gly	Ala	Asp	-Val
10	Gly-Gly-	Gly	Ala	Asp	-Ile
11	Gly-Gly-	Asn	Thr	Glu	-Val
12	Gly-Ser-	Asn	Thr	Glu	-Val
13	Gly-Gly-	Asn	Ser	Glu	-Val
14	Gly-Ser-	Gly	Ala	Asp	-Val
15	Ala-Gly-	Thr	Thr	Glu	-Val
16	Gly-Ser-	Thr	Ser	Glu	-Val
17	Asn-Asn-	Phe	Ser	Glu	-Val

[0020] 一般式(1)、R₁、R₂、R₃、R₄及びR₅において、これを構成する各種アミノ酸は、L体、D体又はDL体のいずれであっても、又はL体、D体又はDL体が適当に混じっているもののいずれであっても構わないが、全てL体であるものが好ましい。

[0021] 本発明において使用するウロテンシンII様

【化9】

-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-を分子中に有するペプチド化合物であり、例えば生体由来であるウロテンシンII及びそれと類似構造を有するペプチド化合物であり、具体的には、例えば下記一般式

(1)で表わされるペプチド化合物が挙げられる。

[0015]

【化10】

10

グリシン、Proとはプロリン、Pyrとはピログルタミン酸、Glnとはグルタミン、Hisとはヒスチジン、Thrとはトレオニン、Alaとはアラニン、Asnとはアスパラギン、Serとはセリン、Leuとはロイシン、Pheとはフェニルアラニン、Valとはバリン、Lysとはリジン、Cysとはシステイン、Aspとはアスパラギン酸、Trpとはトリプトファン、Ileとはイソロイシンを示す。

[0018] 一般式(1)で表わされるペプチド化合物の具体例は、例えば以下の表1の化合物である。

[0019]

ペプチド化合物は、例えば生体からの抽出により、また、Mori, M. et al.が報告しているペプチドシンセサイザーを用いる合成方法(Biochem. Biophys. Res. Commun. 265: 123, 1999)に従って得る事ができる。

[0022] 本発明において使用するウロテンシンIIは、例えばヒトをも含む哺乳類、両生類、又は魚類等か

11

ら由来の公知ペプチド化合物であり、例えば、ヒト、ブタ、ラット、マウス、カエル、ハゼ、コイ、マス、sucker, flounder, sturgeon, paddlefish, skate, petromyzon, dogfish 又は lamprey から得られたものが挙げられ、これらのウロテンシンIIは、具体的には、例えば前記表1で表わされる、化合物1(ヒト)、化合物2

(ブタ)、化合物3、4(ラット)、化合物5、6(マウス)、化合物7(カエル)、化合物8(ハゼ)、化合物9~12(コイ)、化合物13(マス)、化合物14(sucker)、化合物15(flounder)、化合物16(sturgeon や paddlefish) 又は化合物17(skate, petromyzon, dogfish や lamprey) 等の化学構造を有するものである。

【0023】本発明において使用する薬理学的に許容される塩の具体例としては、例えばナトリウム塩もしくはカリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩もしくはカルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩もしくはヨウ化水素酸塩等のハロゲン化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、スルホン酸もしくはリン酸塩等の鉱酸との酸付加塩、メタンスルホン酸塩もしくはエタンスルホン酸塩等の低級アルキルスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩等のハロゲノ低級アルキルスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩等の非置換アリールスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩等の置換アリールスルホン酸塩、酢酸塩、乳酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シウ酸塩、安息香酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸もしくはタル酸塩等の有機酸塩又はグリタミン酸塩もしくはアスパラギン酸塩等のアミノ酸塩を挙げることができる。

【0024】本発明において使用するウロテンシンII様ペプチド化合物又はその薬理学的に許容される塩を血管新生促進剤として使用する際には、各種注射剤、経皮粘膜投与剤、経口剤等の各種投与形態が可能であり、投与形態に応じた種々の剤形で使用される。投与の形態としては、カテーテルを用いての心室内腔より心筋肉への直接注入や冠状動脈内の狭窄又は閉塞部分にカテーテルを用いて局所的に放出又は塗布することも挙げられる。投与剤形としては、例えば静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、皮内注射等用の注射剤、懸濁注射剤、凍結乾燥等の用時溶解型注射剤、坐剤、経鼻剤等の経粘膜投与剤、点眼剤、吸入剤、貼付剤、軟膏剤もしくはスプレー剤、又は錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤もしくは懸濁液等の経口剤を挙げることができる。投与量は、患者の症状、年齢、体重、治療目的、投与方法、投与時期、投与日数又は投与期間によっても異なるが、一般に0.001~20mg/日である。

【0025】本発明の血管新生促進剤を製剤化するには、通常知られた方法が適用される。例えば、製剤用担体が液体の場合は、溶解するもしくは分散させ、また、製剤用担体が粉末の場合は、混合するもしくはこ

10

20

30

40

12

れに吸着させ、さらに目的に応じて、これらに医薬品として許容される保存剤、安定化剤、抗酸化剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、湿潤剤、滑沢剤、着色剤、芳香剤、香味剤、剤皮、懸濁化剤、乳化剤、溶解補助剤、緩衝剤、等強化剤、塑性剤、界面活性剤又は無痛化剤等を含有させることもできる。

【0026】本発明の血管新生促進剤に使用する製剤用担体としては、例えば、水、注射蒸留水、生理食塩水、精製水、グルコース、フラクトース、白糖、ラクトース(乳糖)、デンプン、セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、グリセリン、イノシトール、マンニトール、キシリトール、ソルビトール、グルクロン酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、キチン、キトサン、グリシン、アラニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、ヒト血清アルブミン、ヒト血清グロブリン、コラーゲン、ゼラチン、アルギン酸、タルク、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、尿素、シリコーン樹脂、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、アスコルビン酸、アルファートコフェロール、エチレングリコール、ポリエチレングリコール又は二酸化ケイ素等が挙げられる。

【0027】本発明の血管新生促進剤中のペプチド化合物の含量は、製剤により種々異なるが、通常0.1~100重量%である。また、例えば、注射液の場合には、通常0.1~5重量%の有効成分を含むようにすることが好ましい。

【0028】本発明のウロテンシンII様ペプチド化合物又はその塩の血管新生作用を指標として血管新生阻害剤をスクリーニングする方法としては、例えば実験動物(例えばウサギ、ラット又はマウス等の動物)の角膜における反応を利用した方法が挙げられる。この方法の実施の一例として、メスで動物の角膜に傷をつけ、ペレットを挿入するためのポケットを眼球の頭頂寄りの血管叢またはその反対側の血管叢に向かって二ヶ所作成した。ポケットの先端は、リンバス(角膜と強膜の連接部結合部)から2mm離した。ポケット内に被験化合物を溶解又は懸濁しマイナス温度下で一晩静置し固まったペレット又はコントロールペレットをまず挿入し、次にヒトウロテンシンIIを含むペレットを挿入した。一定期間(例えば5日間)経過後、リンバスからペレットに向って新生した血管の長さをメジャーを用いて測定し、被験化合物の血管新生阻害の指標とした。

【0029】また、本発明のウロテンシンII様ペプチド化合物又はその塩の血管新生作用を指標として血管新生阻害剤をスクリーニングする別の方法としては、例えばItoh, H. et al.が報告(Eur. J. Pharmacol. 149: 61-66, 1988)しているような、ウロテンシンIIが、細胞膜

50

上にあるウロテンシンIIの受容体を介して作用を示すことを利用して、摘出ラット胸部大動脈標本の収縮反応を行って血管新生阻害剤をスクリーニングする方法、アイソトープで標識したハゼウロテンシンII及びラット胸部大動脈の膜分画を用いたバイオインディケーションアッセイ (Ito h, H., et al., Eur. J. Pharmacol. 149: 61-66, 1988) を利用して、血管新生阻害剤をスクリーニングする方法、Liu, Q., et al. の方法 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 266: 174, 1999) により、ウロテンシンIIがGタンパク質共役型受容体GPR14を刺激する内因性の物質であることを利用して、ラットGPR14を多数発現させたHEK293細胞を用いて、スクリーニングする方法、商業的に入手できるラットウロテンシンIIに対する抗体を用いてラットの脊髄を免疫組織染色することによる血管新生阻害剤のスクリーニング方法、又はブロホルモンコンバーターゼの抑制 (J. Biol. Chem. 273: 26589-26595, 1998) を指標に血管新生阻害剤をスクリーニングする方法等が挙げられる。

【0030】ウロテンシンII様ペプチド化合物の血管新生作用に拮抗する化合物又はその薬理学的に許容される塩とは、例えばウロテンシンII様ペプチド化合物の持つ血管新生作用を阻害する化合物が挙げられる。

【0031】ウロテンシンII様ペプチド化合物の血管新生作用に拮抗する化合物又はその薬理学的に許容される塩を血管新生阻害剤としてして使用する場合は、経口的、又は非経口的に投与される。投与量は、患者の症状、年齢、体重、治療目的又は投与方法によって異なるが、一般に1～600mg/日である。製剤の形としては、例えば錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、カプセル剤、吸入剤、貼付剤、点眼剤、坐剤、スプレー剤、軟膏剤又は注射剤等が用いられる。

【0032】本発明の血管新生阻害剤は、有効成分を通常担体と混合するか、又は担体により希釈するか、又は担体内に包含されるように製剤化され、その製剤は、カプセル、小袋、紙または他の容器の形態であっても良い。担体が希釈剤として作用する場合、固体、半固体または液体物質であってもよく有効成分のために媒介物、賦形剤又は媒体として作用する。即ち、この製剤は、錠剤、丸剤、粉末、口内錠、小袋、カシェ剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳化剤、溶液、シロップ又はエアゾル剤(固体または液状媒体として)、例えば、有効成分を10重量%含む軟膏剤、軟ゼラチンカプセル剤、硬ゼラチンカプセル剤、坐剤、滅菌剤の注射可能な溶液又は滅菌済の包装粉末の形態であってもよい。

【0033】本発明の血管新生阻害剤に使用する適当な担体、賦形剤又は希釈剤のいくつかの例として、ラクトース(乳糖)、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アラビアゴム、リン酸

表2.

ウサギ角膜におけるウロテンシンIIによる血管新生促進作用

10

カルシウム、アルギン酸塩、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、塩類溶液、シロップ、メチルセルロース、ヒドロキシ安息香酸-メチル、ヒドロキシ安息香酸-プロピル、タルク、ステアリン酸マグネシウム又は鉱油を含むことができる。その製剤は、滑沢剤、潤滑剤、乳化剤、懸濁剤、防腐剤、甘味剤又は着色剤を付加的に含むことができる。更にその組成物は、当業者に既知の方法を用いて患者に投与後、活性成分を急速、持続又は遅延放出を行うように製剤化する事ができる。

【0034】

【実施例】以下に本発明の実施例として、ウロテンシンIIを用いての試験例および製剤例を示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0035】実施例1 ウロテンシンIIの血管新生促進作用

ヒトウロテンシンIIの血管新生促進作用をウサギ角膜法 (Abramovitch, R., et al., FEBS Letters 425, 441, 1998) を用いて、検討した。

【0036】実験方法

雌性ニュージーランドホワイトウサギ (3.4～3.7kg、オリエンタル酵母) をペントバルビタールナトリウム (25mg/kg) の静脈内投与により全身麻酔した。さらに、塩酸オキシプロカイン点眼により局所麻酔した。ペレットを挿入するためのポケットを、メスで角膜の中央部に傷をつけ、眼科用スパーテルを切り口に挿入し、眼球の頑頂寄りの血管叢またはその反対側の血管叢に向かって二ヶ所作成した。ポケットの先端は、リンバス(角膜と強膜の連接部結合部) から2mm離した。眼科用スパーテルを用いてポケット内にヒトウロテンシンIIまたは何も含まないペレットを挿入した。ペレットとしては、コントロールとしてジクロロメタンに溶解した10%エチレンビニルアセテート溶液そのもの、その溶液でヒトウロテンシンIIの10μgを溶解させたもの、さらにそれを10%エチレンビニルアセテート溶液で200倍希釈したもの、以上のものを-20℃下で一晩静置することにより溶媒を飛ばして固ませたペレット(直径約2mm) を用いた。ペレットを挿入した後、感染防御のためにアンビシリンナトリウムの10mg/mlを点眼し、さらにその14mg/kgを静脈内投与した。ペレット挿入5日および7日後に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下でリンバスからペレットに向って新生した血管の長さをメジャーを用いて測定し、血管新生の指標とした。

【0037】結果

結果を表2に示す。

【0038】

〔新生した血管の長さ (mm) を表示した〕

角膜に挿入するペレットの内容物 ベレット挿入5日後 ベレット挿入7日後

コントロール(何も含まないペレ

ットを挿入)

0.0

0.0

ウロテンシンII 0.05 μg

0.4

0.7

ウロテンシンII 10 μg

1.5

2.1

〔0039〕表2から明らかなように、ヒトウロテンシンIIは、血管新生促進作用を用量依存的に示した。その作用は、ペレット挿入5日後と早期より認められ、その作用強度も非常に強力であり、本発明の血管新生促進剤の有用性が示された。なお、ヒトウロテンシンIIにより角膜の白濁や白血球の集積といった炎症を惹起する様な副作用や毒性は、認められなかった。

〔0040〕実施例2

ウサギ角膜における反応を利用した血管新生阻害剤をスクリーニングする方法ウロテンシンIIを用いて、ウサギ角膜における反応を利用して血管新生阻害剤を見出す方法を検討した。

〔0041〕実験方法

雌性ニュージーランドホワイトウサギ (3~4 kg、オリエンタル酵母) をペントバルビタールナトリウム (2.5 mg/kg) の静脈内投与により全身麻酔した。さらに、塩酸オキシプロカイン点眼により局所麻酔した。ペレットを挿入するためのポケットを、メスで角膜の中央部に傷をつけ、眼科用スパーテルを切り口に挿入し、眼球の頭頂寄りの血管叢またはその反対側の血管叢に向かって二ヶ所作成した。ポケットの先端は、リンバス(角膜と強膜の接続部結合部) から2 mm離した。眼科用スパーテルを用いてポケット内に、被験化合物を1.0%エチレンビニルアセテート溶液で溶解もしくは懸濁し-20℃下で一晩静置し固まらせたペレット(直径約1 mm) またはコントロールペレットをまず挿入し、次にヒトウロテンシンIIを1.0 μg含むペレット(直径約1 mm) を挿入した。感染防御のためにアンビシリンナトリウム1.0 mg/mlを点眼し、さらに1.4 mg/kgを静脈内投与した。ペレット挿入5日後に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下でリンバスからペレットに向って新生した血管の長さをメジャーを用いて測定し、被験化合物の血管新生阻害の指標とした。

〔0042〕実施例3

本発明の血管新生促進剤の毒性をラットを用いて検討した。

〔0043〕毒性試験

雄性Wistar系ラット (250 g、日本チャールスリバー) をペントバルビタールで麻酔下、ラットウロテンシンII(前記表1の化合物3)の1.0、3.0、10.0、30.0、及び100.0 pmol/kgを、連続的に静脈内へ投与し、毒性作用を検討した。血圧、心拍数及び心電図に対する毒性作用、その他の毒性作用とともに全

10

20

30

40

50

く認められず、本発明の血管新生促進剤の高い安全性が確認された。

〔0044〕製剤例1

ヒトウロテンシンIIを3.0重量部に対し、精製水を加え全量を2.000重量部としてこれを溶解後、ミリボアフィルターGSタイプを用いて除菌濾過する。この濾液2 mgを1.0 mlのバイアル瓶にとり凍結乾燥し、1バイアルに3.0 μgのヒトウロテンシンIIを含む凍結乾燥注射剤を得た。

〔0045〕製剤例2

ラットウロテンシンII(前記表1の化合物3)を3.0重量部に対し、精製水を加え全量を2.000重量部としてこれを溶解後、ミリボアフィルターGSタイプを用いて除菌濾過する。この濾液2 mgを1.0 mlのバイアル瓶にとり凍結乾燥し、1バイアルに3.0 μgのラットウロテンシンIIを含む凍結乾燥注射剤を得た。

〔0046〕製剤例3

ラットウロテンシンII(前記表1の化合物3)を1.00重量部、馬rieいしょでんぶん3.0重量部、結晶乳糖1.50重量部、結晶セルロース1.08重量部及びステアリン酸マグネシウム2重量部をV型混合機で混合し、1錠6.0 mgで打錠し、1錠あたり2.0 mgのペプチド化合物を含有する錠剤とした。

〔0047〕製剤例4

ヒトウロテンシンIIを5.0 mgに対して、微結晶性セルロース4.00 mg、二酸化ケイ素1.0 mg及びステアリン酸マグネシウム5 mgを加えて、硬ゼラチンカプセル剤を得た。

〔0048〕製剤例5

ラットウロテンシンII(前記表1の化合物3)を5.0 mgに対して、微結晶性セルロース4.00 mg、二酸化ケイ素1.0 mg及びステアリン酸マグネシウム5 mgを加えて、硬ゼラチンカプセル剤を得た。

〔0049〕

【発明の効果】本発明のウロテンシンII様ペプチド化合物又はその薬理学的に許容される塩は、優れた血管新生促進作用を有し、この作用に基づく予防薬及び治療薬として有用である。具体的には、血管新生療法に用いる予防薬及び治療薬(血管新生促進剤)として有用である。更に具体的には、循環器疾患、例えば、急性心筋梗塞、不安定狭心症、慢性安定型狭心症、陳旧性心筋梗塞、心房細動による血栓塞栓症、汎発性血管内血液凝固症候群、冠動脈バイパス術後のグラフト閉塞、経皮的感動脈

形成術後の冠動脈の狭窄及び閉塞、人工心臓弁置換術後の血栓性合併症、肺血栓・梗塞症、脳血管障害（一過性脳虚血発作、脳梗塞）、末梢動脈閉塞症（閉塞性動脈硬化症、閉塞性血栓血管炎、血行再建術後の閉塞）、糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、本態性血小板症や血栓性血小板減少性紫斑病の血栓症、溶血性尿毒症症候群、抗リン脂質抗体症候群、川崎病、子癇、並びにペーチェット病の予防及び治療、創傷（褥瘡等の慢性皮膚潰瘍、糖尿病性潰瘍、火傷、角膜創傷、化学療法・放射線療法を受けた癌患者の口腔粘膜炎、皮膚移植等の各種手術後の創傷、胃腸組織の損傷等）の治療に対して有効である。また、ウロテンシンII様ペプチド化合物又はその薬理学的に許容される塩を用いて、その血管新生作用を指標として血管新生阻害剤をスクリーニング方法を見出した。この方法は、血管新生阻害剤を見出す方法として有用であ

10

る。更に、ウロテンシンII様ペプチド化合物の血管新生作用に拮抗する化合物又はその薬理学的に許容される塩は、下記のような病態において強い血管新生阻害作用を示し、この作用に基づく予防薬及び治療薬として有用である。具体的には、腫瘍、例えば悪性黒色腫、悪性リンパ腫、胃癌、腸癌、肺癌、肺腺癌、食道癌、乳癌、肝臓癌、卵巣癌、子宮癌、前立腺癌、腎癌、膀胱癌、脳腫瘍、カポジ肉腫、血管腫、骨肉腫、筋肉腫、並びに血管織維腫の予防薬及び治療薬、眼疾患、例えば糖尿病網膜症、未熟児性網膜症、嫌状赤血球網膜症、網膜静脈閉塞症、角膜移植又は白内障手術に伴う血管新生、血管新生性緑内障、虹彩ルベオーシス、並びにコンタクトレンズ長期装用による角膜内の血管新生の予防薬及び治療薬、並びに炎症性疾患、例えば、慢性関節リウマチ、並びに乾癬症の予防薬及び治療薬として有用である。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.¹ 識別記号
 A 61 P 13/00
 17/02
 19/02
 27/02
 29/00
 35/00
 43/00 107

F I
 A 61 P 17/02
 19/02
 27/02
 29/00
 35/00
 43/00 107
 A 61 K 37/02

マーク (参考)